

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

11 Veröffentlichungsnummer:

0 186 799
A1

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 85115333.8

51 Int. Cl.: **G 01 N 33/52, G 01 N 33/558**

22 Anmeldetag: 03.12.85

30 Priorität: 15.12.84 DE 3445816

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: 09.07.86
Patentblatt 86/28

84 Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI LU
NL SE

71 Anmelder: BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft,
Postfach 1140, D-3550 Marburg 1 (DE)

72 Erfinder: Friesen, Heinz-Jürgen, Dr., Im Dorf 4,
D-3550 Marburg 21 (DE)
Erfinder: Grenner, Gerd, Dr., Höhenweg 72,
D-3550 Marburg 1 (DE)
Erfinder: Pauly, Hans-Erwin, Dr., Finkenstrasse 1,
D-3563 Dautphetal 2 (DE)
Erfinder: Kohl, Helmut, Dr., Goethestrasse 32,
D-3552 Wetter (DE)
Erfinder: Habenstein, Klaus, Dr., Im Ketzergund 33,
D-3552 Wetter (DE)
Erfinder: Stärk, Joseph, Dr., Im Winkel 2,
D-3557 Ebsdorfergrund 8 (DE)

74 Vertreter: Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr. et al,
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt/Main 80 (DE)

54 Flächenförmiges diagnostisches Mittel.

57 Es wird ein festes diagnostisches Mittel zur quantitativen Bestimmung von bioaffinen Substanzen in biologischen Flüssigkeiten beschrieben. Weiterhin wird ein Verfahren beschrieben, in dem die biologische Flüssigkeit mit einem bestimmten Funktionsfeld des Mittels in Berührung gebracht wird, die Flüssigkeit mehrere nebeneinander liegende geeignete Reagenzkomponenten enthaltende Funktionsfelder durchwandert und eine oder mehrere bioaffine Substanzen in solchen Funktionsfeldern nachgewiesen werden, die jeweils für die nachzuweisende Substanz mindestens einen bioaffinen Bindungspartner an eine Festphase gebunden enthält.

EP 0 186 799 A1

Flächenförmiges diagnostisches Mittel

- Die Erfindung betrifft ein festes diagnostisches Mittel, bestehend aus mehreren Funktionsfeldern, welches zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Substanzen oder Analyten in biologischen Flüssigkeiten dient. Die
- 5 Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren unter Verwendung dieses Mittels, wobei nach Kontakt des Mittels mit der Flüssigkeit die Analyten mit spezifischen bioaffinen Bindungspartnern reagieren und mit Hilfe von Markierungsreagenzien nachgewiesen werden.
- 10 In der Diagnostik hat die Fähigkeit, spezifische Verbindungen zu identifizieren und zu bestimmen, die Überwachung von Medikamentengaben, Quantifizierung von physiologisch aktiven Verbindungen oder ihrer Folgeprodukte
- 15 sowie Diagnose von Infektionen ermöglicht. Den Immunoassay-Methoden (RIA, ELISA, Agglutinationstest) kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Die bei den Tests ausgenutzten spezifischen Bindungsreaktionen beschränken sich nicht auf immunologische Interaktionen, wie Antigen-
- 20 bzw. Hapten-Antikörper-Wechselwirkungen, sondern benutzen auch bioaffine Wechselwirkungen, wie Lectin-Zucker, Wirkstoff-Rezeptor.
- Vorhandene Tests sind zwar empfindlich und spezifisch,
- 25 jedoch aufgrund der langen Testdauer (meist mehrere Stunden oder sogar Tage) und der häufigen Testschritte, wie Immunreaktion, Waschschrte, enzymatische Reaktion,

stellen sie keine bequemen Anwendungsformen dar. Die langen Testzeiten sind mit dem Einsatz in der Notfall-diagnostik nicht verträglich.

- 5 Integrierte trockenchemische Testelemente, wie sie in der vorgestellten Erfindung beschrieben werden, vereinfachen die Testdurchführung und verkürzen die Testzeiten.

- Testelemente, bestehend aus übereinandergeschichteten
10 Funktionszonen, die zum Nachweis von Analyten mit bioaffinen Bindungseigenschaften dienen, sind bereits bekannt. In EPA 0 097 952 und in DE-OS 33 29 728 sind solche beschrieben, bei denen sich das signalproduzierende System (SPS) auf die Fluoreszenzmarkierung eines der bioaffinen
15 Reaktions- oder Bindungspartner beschränkt. In USP 4,446,232 und in USP 4,472,498 sind außerdem Testelemente beschrieben, die zum einen als SPS Markierungsenzym und chromogenes Substrat enthalten und zum anderen den Nachweis des Analyten in frei beweglichen, nicht an eine
20 Festphase gebundenen Komplexen vorsehen.

- Testelemente mit nebeneinander angeordneten, flächenförmigen Funktionsbereichen sind nach Art eines Teststreifens in USP 4,366,241 oder dem Äquivalent EPA 0 046 004
25 beschrieben. Hier ist einer der bioaffinen Reaktionspartner in einem ersten, am einen Ende des Teststreifens liegenden Funktionsbereich als Festphase gebunden. Bei Kontakt der Lösung des Analyten mit diesem ersten Funktionsbereich wird der Analyt dort gebunden. Das Testelement muß zuerst an genanntem ersten Funktionsbereich mit
30 der Lösung des Analyten, anschließend mit einer Lösung des markierten, in der Spezifität von dem Festphasenreaktionspartner verschiedenen Reaktionspartner des Analyten und im Falle einer Enzymmarkierung in einem dritten
35 Schritt mit einer Lösung von chromogenem Substrat in Berührung gebracht werden.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß ein trockenes, alle Reagenzkomponenten enthaltendes, flächenförmiges diagnostisches Mittel herstellbar ist, mit dem Analyten mit bioaffinen Eigenschaften nachgewiesen werden können.

5

Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches Mittel zum Nachweis oder zur Bestimmung einer Komponente eines bioaffinen Bindungspaares (Analyt) in einer Flüssigkeit, bestehend aus mehreren flächenförmigen Zonen, die hintereinander angeordnet sind und über ihre Kanten miteinander in saugfähigem Kontakt stehen, enthaltend eine Elutionsmittelauftragzone (EMAZ) am einen Ende und eine Saugzone (SZ) am anderen Ende des Mittels sowie dazwischenliegende weitere saugfähige Zonen, in denen zu bioaffinen Wechselwirkungen mit dem Analyten befähigte Reaktionsteilnehmer so angeordnet sind, daß miteinander reaktionsfähige Reaktionsteilnehmer räumlich getrennt vorliegen, wobei

ein Reaktand kovalent oder adsorptiv oder über eine bioaffine Wechselwirkung in einer zwischen der EMAZ und SZ und mit der SZ in Kontakt befindlichen Zone, der Festphasenzone (FPZ) fixiert ist oder in einer im Mittel ablaufenden Reaktion durch einen kovalent oder adsorptiv oder über eine bioaffine Wechselwirkung in der FPZ fixierten weiteren Reaktanden gebunden wird und wobei

die Analytauftragzone die EMAZ oder eine Zone zwischen EMAZ und SZ ist, dadurch gekennzeichnet, daß

ein markierter Reaktand sich in einer Zone zwischen der EMAZ und der FPZ nicht gebunden befindet.

Ein zweiter oder weitere Analyten als Bestandteil derselben Lösung können mit dem Mittel gleichzeitig nachgewiesen werden, wenn diese von dem ersten verschiedene bioaffine Eigenschaften besitzen. Sie werden ebenfalls in einem einzigen Funktionsbereich, einer für sie zuständigen Festpha-

senzone, in gleicher Weise wie der erste Analyt nachgewiesen. Die Funktionsbereiche für den Nachweis des zweiten oder weiterer Analyten liegen auf dem flächenförmigen Mittel vor oder hinter dem Funktionsbereich für den Nachweis des ersten Analyten. Das Mittel kann auch mehrere Festphasenzonen, die für einen Analyten und unterschiedliche Meßbereiche dieses Analyten zuständig sind, enthalten. Das Mittel und seine Komponenten liegen in trockener Form vor.

- Das flächenförmige diagnostische Mittel besteht aus einem oder auch aus mehreren, hintereinander angeordneten Streifen aus Materialien, die für wässrige Lösungen saugfähig sind. Die Streifen sind auf einer festen Unterlage fixiert. Sie enthalten die für das jeweilige diagnostische Mittel notwendigen Reagenzkomponenten und werden somit zu Funktionsfeldern oder Funktionsbereichen. Das an einem Ende des streifenförmigen Mittels liegende Funktionsfeld (Lösungsmittelauftragzone) wird mit Analytlösung durch Eintauchen in diese oder durch Auftragen derselben in Berührung gebracht. Die Lösung durchwandert alle Funktionsbereiche. Die Saugfähigkeit der Trägermaterialien, aus denen die Streifen bestehen, verursacht einen Flüssigkeitsstrom, der am anderen Ende des streifenförmigen Mittels zum Stillstand kommt. Der Analyt kann auch im mittleren Bereich des Mittels aufgebracht und anschließend ein Flüssigkeitsstrom vom einen zum anderen Ende des Mittels erzeugt werden.
- 20 Die Probe muß dabei nicht direkt auf den chromatographierenden Teil des Teststreifens aufgegeben werden. Sie kann auch auf ein saugfähiges Material, das auf den Teststreifen aufliegt und das die Funktion hat, Blutzellen aus der Probe zu entfernen, aufgetragen werden. Die Probe gelangt dann nach Filtration auf den Teststreifen.
- 25 Bei diesem Filtrationsprozeß kann gleichzeitig eine Zugabe von Reagenzien durch Herauslösen von in dem Filter trockenen vorliegenden Komponenten erfolgen. Durch solche Komponenten können Störfaktoren aus der Lösung beseitigt werden. So kann etwa durch ein geeignetes Oxidationsmittel die in einer Probe enthaltene Ascorbinsäure, die bei Verwendung von Oxidasen und Peroxidasen als Markierungsmittel stört, unschädlich gemacht werden. Desweiteren kann das Filter auch die Funktion eines Adsorbens haben, das Störfaktoren durch Adsorption aus der Probe entfernt. Filtrations-, Adsorbens- und
- 30
- 35

Reagenzzumischfunktion zur Probenkonditionierung für den Test kann auch von der Elutionsmittelauftragzone oder einer dahinterliegenden Zone übernommen werden.

- 5 Die Verteilung des Lösungsmittels in den einzelnen Funktionsbereichen ist abhängig von der Saugfähigkeit und der Dimensionierung der verwendeten Materialien.

- Die Lösungsmittelauftragzone kann die Funktion eines
- 10 Volumendosierelementes haben, wie in DE 30 43 608, DE 23 32 760, USP 3,464,560, USP 3,600,306, USP 3,667,607, USP 3,902,847, USP 4,144,306 und USP 4,258,001 beschrieben wurde. Es kann die verschiedenen, für die Funktion des
- 15 Testelementes erforderlichen Reagenzien in Trockenform enthalten. Die Lösungsmittelauftragzone kann ein Stück Vliespapier sein, das sich an einem Ende des Testelementes befindet und das sich durch bloßes Eintauchen in eine Lösung, z.B. die der Probe oder durch kurzes Über-
- 20 spülen mit Leitungswasser mit einem definierten Flüssigkeitsvolumen vollsaugt und anschließend die Flüssigkeit langsamer und in kontrollierter Weise an die folgenden Zonen weitergibt. Die Lösungsmittelauftragzone ist so dimensioniert, daß sie genügend Flüssigkeit hergibt, um diese zum anderen Ende des Mittels, dem Ende der Saug-
- 25 zone wandern zu lassen.

- Zwischen Lösungsmittelauftragszone und Saugzone befinden sich die Funktionsbereiche, in denen Reaktionskomponenten für den Testablauf enthalten sind und in denen alle
- 30 Reaktionsschritte des Testablaufes stattfinden. Ein Teil der Reaktionskomponenten für den Testablauf kann auch in der Probenauftragszone untergebracht sein. Die Saugzone hat die Aufgabe, überschüssige, freibewegliche Reagenzkomponenten und Reaktionsprodukte des signalproduzierenden Systems aufzunehmen.
- 35

- Die saugfähigen Trägermaterialien in Form von einem oder mehreren Streifen als Bestandteile der verschiedenen Funktionsbereiche können wahlweise aus Cellulose, aus chemisch derivatisierter Cellulose oder aus Kunststoff
- 5 poröser oder faseriger Struktur mit hinreichend hydrophilen Eigenschaften wie auch aus Kunststoffmembraneingebetteten Partikeln wie Cellulose oder Silicagel und weiterhin aus hydrophilen, aber wasserunlöslich gemachten Naturprodukten bestehen. Eine Kombination von
- 10 Streifen, bestehend aus verschiedenen Materialien kann verwendet werden. Die Auswahl von geeigneten saugfähigen Materialien erfolgt gemäß den Anforderungen an das jeweilige diagnostische Mittel.
- 15 Die bioaffinen Reagenzkomponenten sind bei verschiedenen Ausführungsformen von immunchemischen, diagnostischen Mitteln Antigene, Haptene oder Antikörper. Im Falle des Nachweises von Glycoproteinen oder Oligosacchariden, die sich an Lectine binden, kann ein bioaffiner Reaktions-
- 20 partner das spezifische Lectin sein, der zweite bioaffine Reaktionspartner ein Antikörper, der gegen eine von dem Lectin verschiedene Bindungsstelle des Analyten gerichtet ist. Im Falle des Nachweises von mikrobiellen Wirkstoffen kann der eine Bindungspartner die Rezeptorsub-
- 25 stanz für den Wirkstoff, der zweite Bindungspartner ein Antikörper gerichtet gegen eine andere Bindungsstelle des Wirkstoffs, sein.
- Ein bioaffiner Bindungspartner wird während des Reaktionsablaufs oder ist schon vorher an das Trägermaterial in dem Funktionsbereich gebunden, der zum Nachweis des Analyten vorgesehen ist (Festphasenzone). Er wird auch Festphasen-Bindungspartner genannt. Der oder die übrigen Bindungspartner sind in den Trägermaterialien
- 30 enthalten. Sie sind mit einer Markierung versehen.
- 35

Von den verschiedenen, bekannten Markierungsmöglichkeiten wird die Enzymmarkierung bevorzugt. Sie erfordert chromogene, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz erzeugende Substratsysteme. Die Chemilumineszenzmarkierung stellt
5 ein weiteres Beispiel einer Markierung, die erst nach Zugabe eines Reagenzes gemessen wird, dar. Gemessen werden kann dabei die Chemilumineszenz selbst oder eine Fluoreszenz, die durch sie angeregt wird. Die Fluoreszenzmarkierung wird meist gemessen, ohne daß die Zugabe
10 eines Reagenzes erforderlich ist. Es kann aber auch wie bei der Verwendung bestimmter Seltenerdchelate erwünscht sein, den zu messenden Fluorophor erst durch Zugabe eines Reagenzes zu erzeugen oder einen zweiten Fluorophor zuzugeben, der durch den ersten angeregt wird oder
15 den ersten anregt. Die Fluoreszenz kann einfach, zeit-aufgelöst oder als Fluoreszenzpolarisation gemessen werden.

Ein zum Nachweis benötigtes Reagenz kann nach dem Trennschritt mit dem nachzuweisenden Immunkomplex auf verschiedene Weise in Reaktion gebracht werden. Ein Teil
20 des signalproduzierenden Systems kann in der Festphasenzone vorkommen. Ein zum Nachweis der Markierung benötigtes Reagenz kann nach genügendem Waschen der Festphase
25 beim heterogenen Immunoassay mit Detektion in der gebundenen Phase in verschiedenen Ausführungsformen verzögert aufgegeben werden. Möglichkeiten sind z.B.:

Aufbringen von Reagenzien durch einen zum Hauptflüssigkeitsstrom parallel geschalteten, langsamer fließenden Flüssigkeitsstrom, welcher vom Elutionsmittelreservoir
30 ausgeht und vor der Zone mit der markierten Komponente einmündet. Der parallel geschaltete Flüssigkeitsstrom kann gesteuert werden durch Verwendung eines langsamer chromatographierenden saugfähigen Mediums, etwa eines
35 entsprechend langsam chromatographierenden Papiers oder

eines Papiers, das stellenweise mit "den Weg vorübergehend blockierenden Komponenten", wie z.B. beim Auflösen eine hohe Viskosität verleihende Polymere (z.B. Polyvinylalkohole, Dextrane), imprägniert ist.

5

Das Aufbringen von Reagenzien kann nach genügendem Waschen der Festphase (= Beendigung der Chromatographie) durch Niederdrücken eines Elementes, das fester Bestandteil des Testelementes ist, erfolgen. Das "Niederdrücken" kann mechanisch oder durch Entfernen von Abstandshaltern durch Einwirkung des Flüssigkeitsstromes erfolgen. Beispielsweise kann das mechanische Niederdrücken eines die Reagenzien enthaltenden Elementes durch Niederdrücken einer Klappe oder eines durch Abstandshalter gehaltenen Papiers erfolgen. Das Herabsenken eines die Reagenzien enthaltenden Elementes unter Einwirkung des Flüssigkeitsstromes kann z.B. erreicht werden durch Übereinanderlaminieren von Festphase, eines wasserlöslichen Polymeren und des Reagenzträgers (z.B. ein entsprechend imprägniertes Papier).

Ein verzögertes Einbringen von Reagenzien in den Flüssigkeitsstrom kann geschehen unter Verwendung von mikrokapseltem Reagenz, das erst nach genügendem Waschen der Festphase aus der Verkapselung austritt oder durch Überziehen des in der Matrix anhaftenden Reagenzes mit sich langsam auflösenden Komponenten.

Eine für den Sonderfall der Enzymmarkierung dargestellte Möglichkeit sieht wie folgt aus: Bei Verwendung einer Peroxidasemarkierung kann vor die Festphasenzone eine Glucoseoxidasezone gesetzt werden. In den Flüssigkeitsstrom wird dann Glucose und auch das Chromogen mit inkorporiert, was zur Farbbildung hinter der Glucoseoxidase führen kann. Wesentliche Farbbildung wird erst beobachtet, wenn bei entsprechend hoher Peroxidasekon-

zentration genügend H_2O_2 durch die Oxidase gebildet wird. Diese Bildung des Peroxyds setzt langsam ein, erreicht eine optimale Konzentration und schließlich eine hohe Konzentration, die zu einer Inhibierung des Enzyms und damit automatischem Stoppen der Farbbildung führt. Diese Färbung kann moderiert werden, wenn in die Oxidasezone oder davor ein H_2O_2 -Fänger z.B. ein Thioether als mildes Reduktionsmittel oder das Enzym Katalase inkorporiert werden.

10

Es wird bei diesem Beispiel durch eine Verzögerungsschaltung unter Zuhilfenahme eines Enzyms ein Reagenz zum Nachweis der Markierung erzeugt. Die Farbbildung in der Festphasenzone setzt erst ein, nachdem diese Zone durch den Flüssigkeitsstrom von nicht spezifisch gebundener Markierung genügend freigewaschen wurde.

Zur Herstellung der Festphasenzone gibt es mehrere Möglichkeiten. Die dort fixierten Komponenten können chemisch kovalent oder adsorptiv an einen saugfähigen Träger gebunden sein, der ein Teil des Testelementes ist. Diese Komponenten können auch an eine Partikeldispersion, die nach Auftrag auf einen saugfähigen Träger am Auftragsort fixiert bleibt, gebunden sein. Beispielsweise sind Suspensionen von Zellen, die auf der Oberfläche spezifische Rezeptoren tragen, wie etwa *Staphylococcus aureus* Cowan I-Zellen oder Latexpartikel, die auf der Oberfläche bioaffine Bindungspartner gebunden tragen, geeignet, in einer Papiermatrix fixiert zu werden. Die an pipettierbare Träger gebundenen wie auch die nicht gebundenen Komponenten des Teststreifens können auf die saugfähige Matrix des Elementes durch Lufttrocknung eingetrocknet werden; Gefriertrocknungsschritte sind nicht unbedingt erforderlich.

35

Einige Testabläufe seien beispielhaft als Ausführungs-
formen dargestellt, die unabhängig von der verwendeten
Markierung zu sehen sind. Sie sind der Einfachheit
halber nur für den Nachweis eines einzigen Analyten mit
5 dem diagnostischen Mittel beschrieben.

Für den Fall, daß der Analyt nur eine einzige bioaffine
Bindungsstelle besitzt oder nur eine bioaffine Bindungs-
stelle von mehreren ausgenutzt wird, seien folgende zwei
10 Ausführungsformen, die dem Prinzip des kompetitiven
Immunoassays entsprechen, dargestellt:

Der Festphasen-Bindungspartner ist kovalent oder adsorp-
tiv an das Trägermaterial des Festphasen-Funktionsbe-
15 reichs gebunden. Die Lösung des Analyten macht eine dem
in dem diagnostischen Mittel enthaltene vorgegebene
Menge von markiertem Analyt beweglich. Beide Komponenten
wandern in das Funktionsfeld, welches den Festphasen-
Bindungspartner enthält und konkurrieren um die Bindung
20 mit dem Festphasen-Bindungspartner. Ist der Anteil des
Analyten gegenüber dem markierten Analyten hoch, wird
wenig markierter Analyt gebunden. Ist er niedrig, wird
viel markierter Analyt gebunden.

25 Der Festphasen-Bindungspartner ist in einem Funktions-
bereich vor dem Festphasen-Funktionsbereich als nicht
gebundene Komponente untergebracht. Die ankommende
Lösungsmittelfront transportiert ihn in den Festphasen-
Funktionsbereich, wo er gebunden wird. Diese Festphasen-
30 bindung wird durch bioaffine Bindungssysteme erzeugt,
die unabhängig von dem Bindungssystem des Analyten sind.
Ein mit Biotin konjugierter Bindungspartner bindet sich
an trägergebundenes Avidin. Ein Immunglobulin, wie IgG
als Bindungspartner wird über sein Fc-Teil an träger-
35 gebundenes Protein A von *S. aureus* fixiert oder von
einem träger-gebundenen, nicht idiotypischen Antikörper
gebunden.

Analyt und markierter Analyt konkurrieren als Bestandteil des diagnostischen Mittels während des Funktionsablaufs um die Bindungen an den Festphasen-Bindungspartner, wie zuvor beschrieben. Diese Konkurrenzreaktion
5 spielt sich teilweise mit dem gelösten und teilweise mit dem schon festphasengebundenen Festphasen-Bindungspartner ab.

Sind bei einem Analyten zwei Bindungsstellen mit unterschiedlicher Spezifität vorhanden, sind mehrere Ausführungsformen des diagnostischen Mittels denkbar, die dem Prinzip des Sandwich-Immunoassays entsprechen. Von diesen
10 seien ebenfalls zwei im folgenden dargestellt:

15 Ist der Festphasen-Bindungspartner kovalent oder adsorptiv an das Trägermaterial des Festphasen-Funktionsbereichs gebunden, bildet der Analyt mit dem markierten Bindungspartner einen binären Komplex, der mit dem Lösungsmittel in den Festphasen-Funktionsbereich hinein-
20 wandert und dort mit dem Festphasen-Bindungspartner reagiert, wobei sich ein ternärer an der Festphase gebundener Komplex ausbildet, der über die Markierung des ersten Bindungspartners nachweisbar ist. Der überschüssige markierte Bindungspartner wird durch das Lösungsmittel
25 in den sich anschließenden Funktionsbereich, in die Saugzone abgeführt.

Wenn der Festphasen-Bindungspartner in dem diagnostischen Mittel in nicht gebundener Form vorliegt und durch das
30 Lösungsmittel beweglich wird, werden die beiden bioaffinen Reaktionspartner des Analyten in den Funktionsbereichen so untergebracht, daß der Analyt mit beiden Partnern gleichzeitig oder nacheinander reagiert und daß der gebildete ternäre Komplex anschließend in den Fest-
35 phasen-Funktionsbereich wandert, wo er, wie schon zuvor beschrieben, über ein zweites, von dem des Analyten

unabhängigen, bioaffines System an die Festphase gebunden wird.

5 Zur Veranschaulichung der zuvor beschriebenen und weiteren Ausführungsformen, die dem immunometrischen Testprinzip, dem Prinzip des indirekten Antikörpernachweises oder dem ELA-Prinzip (Enzyme-Labelled-Antigen) des Immunoassays entsprechen, sind Verteilung der Komponenten des Mittels in den Funktionsbereichen sowie nach Reaktions-

10 ablauf die Zusammensetzung des Festphasenkomplexes, dessen Menge ein Maß für die Analytenkonzentration in der Probe ist, beispielhaft in den Übersichten I und II dargestellt.

Übersicht I: Beispielhafte Testaufbauten mit Probe oder Probenvorverdünnung
als Elutionsmittel

Testprinzip	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> ↓ Probe </div> <div style="text-align: center;"> Detektionszone ↓ Saugzone </div> </div>						in V nachgewiesener Komplex
	I	II	III	IV	V	VI	
kompetitiv, z.B.		O*	C ₁		C ₂		*-O ₁ -C ₂
		O*			C ₁		*-O ₁
		C ₁	O*		C ₂		*-O ₁ -C ₂
	Glc, TMB	O*	C ₁ ^{G00}		C ₂		*-O ₁ -C ₂ * - P00
	Glc, TMB	O*	C ₁	G00 oder G00-I	C ₂		*-O ₁ -C ₂ * - P00
	TMB	O*	C ₁		C ₂ ^{Verbort}		*-O ₁ -C ₂ * - P00
Sandwich, z.B.		C ₁ ^T	C ₂		C ₃		C ₁ -O ₂ -C ₃
immunosmetrisch, z.B:		C ₁ *			O ₁		O ₁ *

Symbolerklärung: vgl. Übersicht II

Übersicht II: Beispielhafte Testaufbauten mit separaten Elutionsmittel

Testprinzip						
	I	II	III	IV	V	VI
kompetitiv, z.B.		O*	O ↓	C ₁	C ₂	
Sandwich, z.B.		C ₁ *	O ↓	C ₂	C ₃	
immunometrisch, z.B.			O ↓	C*	O	
indirekter Antikörpernachweis		C*	Y ↓		O	
ELA (enzyme-labeled antigen)			Y ↓	O*		

600

61c

X ↓

O

C

Y

*

- Glucoseoxidase; POD - Peroxidase; TMB - Tetramethylbenzidin;
- α-D-Glucose
- Aufgabe der Komponente X auf die jeweilige Zone
- festphasengebundene Komponente
- bindende Komponente (Rezeptor)
- Antikörper oder Rezeptor mit Bindungsstellen für einen anderen Rezeptor
- Markierung: O - Komponente, die von einem Rezeptor gebunden werden kann

Es wurde gefunden, daß ein voll integrierter Teststreifen, der nach dem Prinzip des heterogenen Immunoassays mit Festphasendetektion arbeitet, nicht nur prinzipiell machbar, sondern auch noch innerhalb eines Zeitraums von
5 weniger als einer Stunde auswertbar ist, wobei Quantifizierbarkeit und die Empfindlichkeit von konventionellen RIAs oder ELISAs erreicht wird. Es wurde der Nachweis von Spurenkomponenten im Bereich von 10^{-12} mol/l bei
benötigten Probemengen von 10^{-16} mol entsprechend z.B.
10 ca. 1 pg bei Reaktionszeiten von weniger als 30 Minuten bei Raumtemperatur ermöglicht. Mit den beschriebenen Anordnungen können jedoch auch Tests geringerer Empfindlichkeitsanforderung ausgeführt werden. Es wurden Standardkurven über zwei bis drei Dekaden bei Auswertung mit
15 dem Reflektometer Sanoquell (Fa. Quelle) erhalten. Die Chromatographiezeit für das Testelement einschließlich vollständiger Farbentwicklung liegt bei maximal 16 Minuten. Die Auswertung kann auch visuell erfolgen. Bei HCG als Analyt lag der Beginn des Meßbereichs in einem
20 Beispiel mit einer an eine Festphase gebundenen Glucoseoxidase und einer Peroxidasemarkierung bei 0,3 ng/ml (entsprechend 3 U/l).

In dem folgenden Beispiel wird als konkrete Ausführungsform die Anwendung des Prinzips des kompetitiven Doppelantikörpertests vorgestellt. Bei dieser Testkonfiguration sind für die Bestimmungsreaktion und den Trennschritt vier Komponenten nacheinander in Reaktion zu bringen, wobei die Reaktionszeiten und die Konzentrationen des
30 Reaktanden kritische Größen sind. Das Beispiel ist keineswegs als limitierend zu betrachten sondern dient lediglich der weiteren Erläuterung des Erfindungsgegenstandes.

Beispiel

Vollintegrierter enzymimmunchemischer Teststreifen zum
Nachweis von HCG mit eingebautem Chromogen-Substrat-
system

1.1. Reagenzien

1.1.1. HCG-Peroxidase-Konjugat

HCG mit einer spezifischen Aktivität von ca. 3000 U/mg wurde von der Fa. Organon bezogen. Peroxidase aus Meerrettich wurde von der Fa. Boehringer Mannheim (Katalog Nr. 413 470) bezogen. Das heterobifunktionelle Reagenz N- γ -Maleimidobutyryloxysuccinimid (GMBS) wurde von der Fa. Behring Diagnostics bezogen und wie von Tanimore et al., 1983, in J.Imm.Meth. 62, 123-131, beschrieben, mit dem HCG umgesetzt. 2-Iminothiolan-hydrochlorid (Fa. Sigma, Kat.- r. I 6256) wurde wie von King et al., 1978, in Biochemistry 17, 1499-1506, beschrieben, mit Peroxidase umgesetzt. Aus dem GMBS-HCG und der Iminothiolan-Peroxidase wurde ein Konjugat wie von Tanimori et al. beschrieben hergestellt. Das Rohkonjugat wurde durch Gelchromatographie an Ultrogel ACA 44 (Fa. LKB) gereinigt. Die Fraktion, in der etwa 1-2 Peroxidasemoleküle pro HCG-Molekül gekoppelt waren, wurde für den Test verwendet. Das Konjugat wurde mit Enzygnost IgE Inkubationsmedium der Behringwerke, Best. o. OS D, im weiteren kurz als Inkubationsmedium bezeichnet, verdünnt.

1.1.2. Antikörper

Antikörper gegen HCG wurden durch Immunisieren von Kaninchen und Antikörper gegen Kaninchen-IgG durch Immunisieren von Ziegen erhalten. Die IgG-Fraktionen wurden aus Serum durch Ammoniumsulfatfällung und Anionenaustauscher-

chromatographie gewonnen und durch Immunadsorption weiter gereinigt. Die angewandten Methoden sind beschrieben in dem Buch "Immunologische Arbeitsmethoden", Helmut Friemel, Herausgeber, 1984, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Der Anti-HCG-Antikörper wurde in dem oben angegebenen Konjugatverdünnungspuffer endverdünnt.

1.1.3. Glucoseoxidase

10 Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* wurde als Lösung mit 300 U/mg bezogen (Fa. Serva, Kat.-No. 22737). Die Glucoseoxidase wurde mit Inkubationsmedium endverdünnt.

1.1.4. Glucose, Tetramethylbenzidin

15 α -D-Glucose und Tetramethylbenzidin-hydrochlorid wurden von der Fa. Serva, Kat.-Nr. 22720 bzw. 35926, bezogen.

1.2. Herstellung des Mittels

20 Die flächenförmigen Funktionsbereiche wurden wie folgt hergestellt:
Zur Herstellung der Elutionsmittelauftragzone wurde ein Vliesschwammtuch der Fa. Kalle, das ein trocken gepresster Kunstschwamm aus regenerierter Cellulose ist, in
25 einer Größe von 20 x 6 mm zugeschnitten. Es wurde mit einer Lösung von 50 mg Glucose und 0,75 mg Tetramethylbenzidin-hydrochlorid je ml Wasser getränkt und im Luftstrom getrocknet.
30 Konjugat, Anti-HCG-Antikörper und Glucoseoxidase (je 5 μ l mit 25 μ l/ml, 100 μ l/ml bzw. 0,1 mg/ml) wurden in gleichmäßigem Abstand auf ein 45 x 5 mm-Stück MN Nr. 1-Papier (Macherey & Nagel) hintereinander aufgetragen und an der Luft eingetrocknet.
35 Als Festphasenzone wurde ein 5 x 5 mm großes Stück Nr. 597-Papier der Fa. Schleicher & Schüll mit Anti-Kanin-

chen-IgG-Antikörper kovalent beschichtet. Dazu wurde der Antikörper an das mit Bromcyan-aktivierte Papier, wie von Clarke et al., 1979, Meth.Enzymology, Vol. 68, 441-442, beschrieben, gekuppelt.

5

Als Saugzone wurde ein 20 x 5 mm-Stück Nr. 2668/8-Papier (Fa. Schleicher & Schüll) verwendet.

10 Die vier Papiere wurden 0,5 - 1 mm überlappend hintereinander mit Hilfe eines doppelseitigen Klebebandes (Tesaband der Fa. Beiersdorf) auf einer festen Unterlage fixiert, so daß ein 5 mm breiter Teststreifen entstand.

1.3. Testdurchführung

15

Zur Durchführung des Tests wurden jeweils 200 µl einer HCG-Verdünnung in Inkubationsmedium auf das Vlies aufgetragen.

20 1.4. Ergebnis

Die chromatographische Entwicklung des Testelementes und die selbsttätig ablaufende Farbentwicklung waren nach 15 Minuten bei Raumtemperatur abgeschlossen und es konnte
25 visuell oder mit einem Reflektometer ausgewertet werden.

Bei Auswertung der Festphasenzone (Nr. 597-Papier) mit dem Blutglucoseauswertegerät Sanoquell der Fa. Quelle ergaben sich folgende Werte:

30

	HCG-Konzentration (U/l)	Meßwerte (mg Glucose pro dl Blut)
5	0,3	107
	3	117
	30	95
	300	70
	3000	0

10

Mit dem Urinteststreifenauswertegerät Rapimat der Behringwerke wurden bei den gleichen Teststreifen folgende Werte erhalten:

	HCG-Konzentration (U/l)	Meßwerte (BIT)
15	0,3	76
	3	76
	30	94
	300	119
	3000	135

20

25 Der hier gezeigte Teststreifenaufbau läßt sich auch realisieren, wenn die Glucoseoxidase und der Anti-HCG-Antikörper sich in der gleichen Zone befinden. Der entsprechend kürzere Teststreifen hat dann eine Testzeit von ca. 10 Minuten.

30

Patentansprüche:

1. Analytisches Mittel zum Nachweis oder zur Bestimmung
einer Komponente eines bioaffinen Bindungspaares
5 (Analyt) in einer Flüssigkeit, bestehend aus mehreren
flächenförmigen Zonen, die hintereinander angeordnet
sind und über ihre Kanten miteinander in saugfähigem
Kontakt stehen, enthaltend eine Elutionsmittelauftrag-
zone (EMAZ) am einen Ende und eine Saugzone (SZ) am
10 anderen Ende des Mittels sowie dazwischenliegende wei-
tere saugfähige Zonen, in denen zu bioaffinen Wechsel-
wirkungen mit dem Analyten befähigte Reaktionsteil-
nehmer so angeordnet sind, daß miteinander reaktionsfä-
hige Reaktionsteilnehmer räumlich getrennt vorliegen,
15 wobei

ein Reaktand kovalent oder adsorptiv oder über eine
bioaffine Wechselwirkung in einer zwischen der EMAZ
und SZ und mit der SZ in Kontakt befindlichen Zone,
20 der Festphasenzone (FPZ) fixiert ist oder in einer im
Mittel ablaufenden Reaktion durch einen kovalent oder
adsorptiv oder über eine bioaffine Wechselwirkung in
der FPZ fixierten weiteren Reaktanden gebunden wird
und wobei
25 die Analytauftragzone die EMAZ oder eine Zone zwischen
EMAZ und SZ ist, dadurch gekennzeichnet, daß

ein markierter Reaktand sich in einer Zone zwischen
30 der EMAZ und der FPZ nicht gebunden befindet.
2. Flächenförmiges diagnostischen Mittel nach Anspruch 1
zum Nachweis von zwei oder mehr Analyten mit jeweils
einer oder mehreren bioaffinen Bindungsstellen in
35 einer Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß es je Ana-

lyt eine räumlich getrennte Festphasenzone enthält, die mit trägergebundenen, für den jeweiligen Analyten spezifischen Bindungspartnern versehen ist und in dem die Analyten getrennt nachgewiesen werden.

- 5
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die EMAZ die Funktion eines Volumendosierelementes hat und mindestens so viel Flüssigkeit an die folgenden Zonen abgibt, daß die Flüssigkeit, durch
10 Kapillarkräfte gesteuert, bis zum Ende der SZ gelangt.
4. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die EMAZ ein Kunststoffschwamm oder eine partikuläre Schicht, bestehend aus hydrophilen
15 Polymeren, ist, die gegebenenfalls Chemikalien, Puffersubstanzen oder andere testnotwendige Substanzen enthalten kann.
5. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenauftragzone Blutzellen
20 zurückhält.
6. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenauftragzone auf eine der
25 flächenförmigen Zonen des chromatographierenden Teils des Mittels auflaminiert ist und mit dieser in saugfähigem Kontakt steht.
7. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß alle oder ein Teil der zum Nachweis der Markierung notwendigen Reagenzien in einer oder mehreren der flächenförmigen Zonen des Mittels oder in einer Zone, die auf eine der flächenförmigen Zonen des chromatographierenden Teils des Mittels auflaminiert ist und mit dieser in saugfähigem Kontakt steht,
30
35 enthalten sind.

8. Verfahren unter Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß alle für den Ablauf der Reaktion erforderlichen, im Mittel vorhandenen Reaktanden in dehydratisierter Form vorliegen und durch die dem Mittel zugeführten Flüssigkeiten rehydratisiert oder solvatisiert werden.
- 5
9. Verfahren nach Anspruch 8, unter Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß nach Aufgabe der den Analyten enthaltenden flüssigen Probe auf die EMAZ oder nach Aufgabe der Probe auf eine Probenauftragzone und Aufgabe eines Elutionsmittels auf die EMAZ die Flüssigkeit bis zum Ende der SZ, durch Kapillarkräfte gesteuert, gelangt und dadurch Reaktionen zwischen im Mittel enthaltenden Reaktionsteilnehmern und dem Analyten in Gang gesetzt werden und nach chromatographischem Abtrennen der nicht spezifisch an die Festphase gebundenen Markierung die Menge der Markierung in der Festphasenzone, die ein Maß für die Analytkonzentration in der Probe ist, bestimmt wird.
- 10
- 15
- 20
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9 unter Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß den im Mittel ablaufenden Reaktionen die Prinzipien der immunologischen Nachweisreaktionen des kompetitiven immunometrischen oder Sandwich-Immunoassays oder des indirekten Antikörpernachweises mit markiertem Antikörper oder des Antikörpernachweises mit markiertem Antigen zugrundeliegen.
- 25
- 30
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8, 9 oder 10 unter Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Markierungsmittel ein Fluorophor ist, der direkt
- 35

- 5 nachgewiesen oder gemessen oder nach Zugabe eines im Mittel vorhandenen Reagenzes nachgewiesen oder gemessen wird oder daß aus dem Markierungsmittel durch Zugabe eines im Mittel vorhandenen Reagenzes ein Fluorophor gebildet wird, der direkt oder nach Zugabe eines weiteren Reagenzes nachgewiesen oder gemessen wird.
- 10 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10 unter Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Markierungsmittel eine zur Chemilumineszenz anregbare Verbindung ist, wobei nach Zugabe eines im Mittel vorhandenen Reagenzes eine Chemilumineszenz nachgewiesen oder gemessen werden kann.
- 15 13. Verfahren nach den Ansprüchen 8, 9 oder 10 unter Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Markierungsmittel ein Enzym ist, dessen Aktivität unter Zuhilfenahme eines im Mittel vorhandenen Reagenzes bestimmt wird.
- 20



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0186799

Nummer der Anmeldung

EP 85 11 5333

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
A	EP-A-0 046 004 (SYVA CO.) * Seite 1, Zeile 1 - Seite 2, Zeile 33; Seite 23, Zeile 17 - Seite 28, Zeile 13; Seite 46, Zeile 25 - Seite 47, Zeile 19; Ansprüche * & US - A - 4 366 241 (Kat. D)	1,3,4, 8-13	G 01 N 33/52 G 01 N 33/558
A	US-A-4 361 537 (M.E. DEUTSCH et al.) * Zusammenfassung; Spalte 2, Zeile 65 - Spalte 4, Zeile 17; Spalte 4, Zeile 43 - Spalte 5, Zeile 53 *	1,8-12	
A	EP-A-0 052 328 (BEHRINGWERKE AG) * Insgesamt * & DE - A - 3 043 608 (Kat. D)	4,6-9	
A	FR-A-2 191 734 (EASTMAN KODAK CO.) * Seite 2, Zeilen 14-45; Seite 5, Zeilen 24-29; Seite 7, Zeile 12 - Seite 9, Zeile 13; Seite 12, Zeilen 4-24; Ansprüche * & DE - A - 2 332 760 (Kat. D)	1-5,11 -13	G 01 N
A	EP-A-0 100 619 (SYVA CO.) * Insgesamt *		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 02-04-1986	
		Prüfer HITCHEN C.E.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet		E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie		D : in der Anmeldung angeführtes Dokument	
A : technologischer Hintergrund		L : aus andern Gründen angeführtes Dokument	
O : mündliche Offenbarung			
P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0186799

Nummer der Anmeldung

EP 85 11 5333

Seite 2

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
A	US-A-3 847 553 (MILES LABORATORIES INC.) * Zusammenfassung; Spalte 1, Zeile 56 - Spalte 2, Zeile 14; Figuren; Spalte 3, Zeile 3 - Spalte 5, Zeile 52; Ansprüche * -----		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 02-04-1986	Prüfer HITCHEN C.E.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

THIS PAGE BLANK (USPTO)